

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-320304

(43) 公開日 平成8年(1996)12月3日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	27/327		G 0 1 N 27/30	3 5 3 R
	27/416			3 5 3 Z
			27/46	3 3 6 B
				3 3 6 C

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平7-237147

(22) 出願日 平成7年(1995)9月14日

(31) 優先権主張番号 特願平7-58939

(32) 優先日 平7(1995)3月17日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 南海 史朗

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 東島 隆治 (外1名)

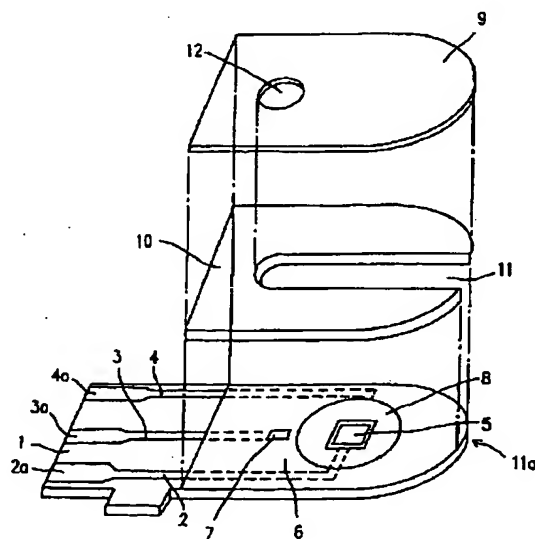
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ、それを用いた定量法および定量装置

(57) 【要約】

【課題】 二電極間の抵抗値変化に基づいて試料液による液絡を検知する方式の定量装置に適用して、測定結果に悪影響を与えない高性能のバイオセンサ、およびそれを用いた定量法を提供することを目的とする。

【解決手段】 絶縁性の基板の同一平面上に、作用極、対極、および第3の電極を含む電極系と、少なくとも作用極および対極上に設けられた酸化還元酵素を含む反応層を有するバイオセンサ。第3の電極を液絡検知用電極および参照極として併用する基質の定量法。



- 1 基板
- 5 作用極
- 7 第3の電極
- 8 対極

BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料液に含まれる基質と酸化還元酵素との反応により生成する電子によって電子受容体を還元し、その電子受容体の還元量を電気化学的に計測することにより、基質を定量するバイオセンサであって、電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および液絡検知用電極として使用される第 3 の電極を有する電極系と、前記電極系の少なくとも作用極と対極上に設けられた少なくとも酸化還元酵素を含有する反応層とを有するバイオセンサ。

【請求項 2】 試料液供給口へ供給された試料液が、前記作用極および前記対極へ達した後、前記第 3 の電極へ到達するように、第 3 の電極が作用極および対極よりも試料液供給口から遠い方の位置に配置されている請求項 1 に記載のバイオセンサ。

【請求項 3】 前記対極が、平面視で一部に切欠部を有する略 C 字形に形成され、その対極の内側に前記作用極が電気絶縁状態で配置され、作用極に接続されたリードが前記切欠部を通して対極の外側へ導出されている請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 4】 前記対極の外周縁の一部に凹部が設けられ、この凹部に前記第 3 の電極が收容されている請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 5】 試料液供給口へ供給された試料液が、前記第 3 の電極へ達した後に作用極へ達するように、第 3 の電極が作用極よりも試料液供給口に近い方の位置に配置されている請求項 1、3、または 4 に記載のバイオセンサ。

【請求項 6】 前記対極と作用極との間に第 3 の電極が電気絶縁状態で配置されている請求項 3 に記載のバイオセンサ。

【請求項 7】 前記反応層が、さらに前記第 3 の電極上にも設けられている請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 8】 前記基板上にカバーが配設され、前記基板とカバーとの間に試料液供給路を構成する空間部が設けられている請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 9】 前記電極系が前記空間部に露出している請求項 8 に記載のバイオセンサ。

【請求項 10】 前記反応層が、さらに電子受容体を含む請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 11】 前記反応層が、さらに親水性高分子を含む請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載のバイオセンサ。

【請求項 12】 電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および第 3 の電極を有する電極系と、前記電極系の少なくとも作用極と対極上に設けられた少なくとも酸化還元酵素を含有する反応層とを有するバイオセンサを用いて、試料液中に含まれる基質を定量する方法であって、前記対極と第 3 の電極との間に電圧

を印加する工程、試料液を前記反応層に供給する工程、試料液の反応層への供給によって生じた対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する工程、前記電気的変化を検知の後、作用極と第 3 の電極および対極との間に電圧を印加する工程、および前記電圧の印加された対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程を有する基質の定量方法。

【請求項 13】 電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および第 3 の電極を有する電極系と、前記電極系の少なくとも作用極と対極上に設けられた少なくとも酸化還元酵素を含有する反応層とを有するバイオセンサを用いて、試料液中に含まれる基質を定量する方法であって、前記対極と第 3 の電極との間に電圧を印加する工程、試料液を前記反応層に供給する工程、試料液の反応層への供給によって生じた対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する工程、前記電気的変化を検知の後、作用極と対極との間に電圧を印加する工程、および前記電圧の印加された対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程を有する基質の定量方法。

【請求項 14】 電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および第 3 の電極を有する電極系と、前記電極系の少なくとも作用極と対極上に設けられた少なくとも酸化還元酵素を含有する反応層とを有するバイオセンサを用いて、試料液中に含まれる基質を定量する方法であって、前記対極と第 3 の電極との間に電圧を印加する工程、試料液を前記反応層に供給する工程、試料液の反応層への供給によって生じた対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する工程、前記電気的変化を検知の後、対極と第 3 の電極との間に継続して電圧を印加しつつ、作用極と第 3 の電極および対極との間に電圧を印加する工程、および前記電圧の印加された対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程を有する基質の定量方法。

【請求項 15】 電気絶縁性基板と、前記基板上に形成された作用極、対極、および第 3 の電極を有する電極系と、前記電極系の少なくとも作用極と対極上に設けられた少なくとも酸化還元酵素を含有する反応層とを有するバイオセンサを用いて、試料液中に含まれる基質を定量する方法であって、前記対極と第 3 の電極との間に電圧を印加する工程、試料液を前記反応層に供給する工程、試料液の反応層への供給によって生じた対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する工程、前記電気的変化を検知の後、対極と第 3 の電極との間に継続して電圧を印加しつつ、作用極と対極との間に電圧を印加する工程、および前記電圧の印加された対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程を有する基質の定量方法。

【請求項 16】 請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載のバイオセンサの反応層に供給された試料液に含まれる基質を定量する装置であって、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第 3 の電極との間の電気的

変化を検知する手段、前記作用極と第 3 の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加する手段、および前記作用極と対極との間に流れる電流を測定する手段を有する基質の定量装置。

【請求項 17】 請求項 1～11 のいずれかに記載のバイオセンサの反応層に供給された試料液に含まれる基質を定量する装置であって、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知する手段、前記対極と第 3 の電極との間に継続して電圧を印加しつつ、前記作用極と第 3 の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加する手段、および前記作用極と対極との間に流れる電流を測定する手段を有する基質の定量装置。

【請求項 18】 請求項 1～11 のいずれかに記載のバイオセンサを着脱可能に接続し、このバイオセンサに供給される試料液に含まれる基質を定量する装置であって、前記バイオセンサの前記第 3 の電極に接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続された A/D 変換回路と、前記バイオセンサの前記作用極にスイッチを介して接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続された A/D 変換回路と、前記両者の A/D 変換回路に接続された制御部とを有し、この制御部は、前記スイッチを前記作用極へのオン、オフの切り替えを制御するとともに、前記スイッチを作用極から絶縁した状態で、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知した後、前記スイッチを作用極に接続した状態で、作用極と第 3 の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加し、作用極と対極との間に流れる電流を測定するように構成された基質の定量装置。

【請求項 19】 請求項 1～11 のいずれかに記載のバイオセンサを着脱可能に接続し、このバイオセンサに供給される試料液に含まれる基質を定量する装置であって、前記バイオセンサの前記第 3 の電極に接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続された A/D 変換回路と、前記バイオセンサの前記作用極にスイッチを介して接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続された A/D 変換回路と、前記両者の A/D 変換回路に接続された制御部とを有し、この制御部は、前記スイッチを前記作用極へのオン、オフを切り替えを制御するとともに、前記スイッチを作用極から絶縁した状態で、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知した後、前記対極と第 3 の電極との間に継続して電位を印加しつつ、前記スイッチを作用極に接続した状態で、作用極と第 3 の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加し、作用極と対極との間に流れる電流を測定するように構成された基質の定量装置。

【請求項 20】 請求項 1～11 のいずれかに記載のバイオセンサを着脱可能に接続し、このバイオセンサに供給される試料液に含まれる基質を定量する装置であって、前記バイオセンサの前記第 3 の電極と前記作用極とにスイッチにより切り替え可能に接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続された A/D 変換回路と、この A/D 変換回路に接続された制御部とを有し、この制御部は、前記スイッチを制御して前記電流／電圧変換回路を作用極または第 3 の電極に択一的に接続するとともに、前記電流／電圧変換回路を第 3 の電極に接続した状態で、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第 3 の電極との間の電気的変化を検知した後、前記電流／電圧変換回路を作用極に接続した状態で、作用極と対極との間に電圧を印加し、作用極と対極との間に流れる電流を測定するように構成された基質の定量装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、試料中の特定化合物について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施するためのバイオセンサ、同バイオセンサを用いた定量法および定量装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 スクロース、グルコースなどの糖類の定量分析法として、旋光度計法、比色法、還元滴定法および各種クロマトグラフィーを用いた方法等が開発されている。しかし、これらの方法は、いずれも糖類に対する特異性があまり高くないので精度が悪い。これらの方法のうち上記旋光度計法によれば、操作は簡便ではあるが、操作時の温度の影響を大きく受ける。従って、旋光度計法は、一般の人々が家庭などで簡易に糖類を定量する方法としては適切でない。近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のタイプのバイオセンサが開発されている。以下に、試料液中の基質の定量法の一例としてグルコースの定量法について説明する。

【0003】 電気化学的なグルコースの定量法としては、グルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4：以下 GOD と略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを使用して行う方法が一般に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサー」講談社）。GOD は、酸素を電子受容体として、基質である  $\beta$ -D-グルコースを D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンに選択的に酸化する。酸素の存在下で、GOD による酸化反応過程において、酸素が過酸化水素に還元される。酸素電極によって、この酸素の減少量を計測するか、あるいは過酸化水素電極によって過酸化水素の増加量を計る。酸素の減少量および過酸化水素の増加量は、試料液中のグルコースの含有量に比例するので、酸素の減少量または過酸化水素の増加量からグルコースの定量を行うことができる。上記方法では、その反応過程からも推測できるように、測定結果は

試料液に含まれる酸素濃度の影響を大きく受ける欠点があり、さらに試料液に酸素が存在しない場合は測定が不可能となる。

【0004】そこで、酸素を電子受容体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子受容体として用いる新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子受容体の還元体を電極上で酸化することにより、その酸化電流量から試料液中に含まれるグルコース濃度を求めることができる。このような有機化合物や金属錯体を酸素の代わりに電子受容体として用いることで、既知量の $\text{GO}_2$ とそれらの電子受容体を安定な状態で正確に電極上に担持させて反応層を形成することが可能となる。この場合、反応層を乾燥状態に近い状態で電極系と一体化させることもできるので、この技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサが近年多くの注目を集めている。

【0005】この使い捨て型のグルコースセンサを用いた場合、測定装置に着脱可能に接続されたセンサに試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定できるようなシステムが提案されている。このような手法は、グルコースの定量だけに限らず、試料液中に含まれる他の基質の定量にも応用可能である。このような手法で試料液中の基質を定量するには、通常、作用極と対極とを有する二電極式のセンサを用いることが多い。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記のようなセンサを用いた測定装置においては、電流応答を得るためにセンサの作用極と対極との間に電圧を印加する以前に、作用極と対極との間に電圧を印加し、その両極間の抵抗値変化に基づいて両極間の液絡を検知し、これによって試料液がセンサに供給されたことを検知する方法をとることが多い。その場合に、液絡を検知するための電圧印加によって両極の界面状態に変化を来し、測定結果に影響を与える場合があった。また、二電極式での測定では、対極を参照極として併用するため、基準となる対極電位が作用極での酸化還元反応に伴い変動し、測定結果に影響を与える場合があった。しかも、試料液が十分量電極系に供給される前に、前記作用極—対極間の抵抗値が変化すると、これを液絡検知信号として測定が始まる場合があり、測定結果に影響を与えるおそれがあった。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために本発明は、絶縁性の基板の同一平面上に、作用極、対極に加えて、第3の電極を新たに設けた電極系を備えるものである。すなわち、本発明のバイオセンサは、試料液に含まれる基質と酸化還元酵素との反応により生成する電子によって電子受容体を還元し、その電子受容体の還元量を電気化学的に計測することにより、基質を定量するバイオセンサであって、電気絶縁性基板と、前記

基板上に形成された作用極、対極、および液絡検知用電極として使用される第3の電極を有する電極系と、前記電極系の少なくとも作用極と対極上に設けられた少なくとも酸化還元酵素を含有する反応層とを有する。

【0008】さらに、前記バイオセンサを用いて試料中の特定化合物の定量をする際、前記第3の電極を液絡検知用電極としてだけでなく、参照極としても併用するものである。本発明の基質の定量方法は、前記バイオセンサの対極と第3の電極との間に電圧を印加する工程、試料液を前記反応層に供給する工程、試料液の反応層への供給によって生じた対極と第3の電極との間の電気的変化を検知する工程、前記電気的変化を検知の後、作用極と第3の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加する工程、および前記電圧の印加された対極と作用極との間に生じた電流を測定する工程を有する。また、本発明の基質の定量方法は、前記の方法において、作用極と第3の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加する工程を、対極と第3の電極との間に継続して電圧を印加しつつ行う。

【0009】本発明のバイオセンサを着脱可能に接続し、このバイオセンサに供給される試料液中に含まれる基質を定量する装置は、バイオセンサの前記第3の電極に接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続されたA/D変換回路と、バイオセンサの前記作用極にスイッチを介して接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続されたA/D変換回路と、前記両者のA/D変換回路に接続された制御部とを有し、この制御部は、前記スイッチを前記作用極へのオン、オフの切り替えを制御するとともに、前記スイッチを作用極から絶縁した状態で、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第3の電極との間の電気的変化を検知した後、前記スイッチを作用極に接続した状態で、作用極と第3の電極および対極との間または作用極と対極との間に電圧を印加し、作用極と対極との間に流れる電流を測定するように構成されている。また、本発明の基質を定量する装置は、バイオセンサの前記第3の電極と前記作用極とにスイッチにより切り替え可能に接続される電流／電圧変換回路と、この電流／電圧変換回路に接続されたA/D変換回路と、このA/D変換回路に接続された制御部とを有し、この制御部は、前記スイッチを制御して前記電流／電圧変換回路を作用極または第3の電極に択一的に接続するとともに、前記電流／電圧変換回路を第3の電極に接続した状態で、試料液の前記反応層への供給によって生じた、前記対極と第3の電極との間の電気的変化を検知した後、前記電流／電圧変換回路を作用極に接続した状態で、作用極と対極との間に電圧を印加し、作用極と対極との間に流れる電流を測定するように構成されている。

【0010】上記のように本発明では、作用極、対極に加えて、新たに加えた第3の電極を液絡検知用電極とし

て用いるために、液絡検知のための電圧を作用極一対極間に印加する必要はない。また、試料液の供給を確実に検知することができる。さらに、酵素と試料中の特定化合物との反応に際しての物質濃度変化を、前記作用極に電圧を印加することで得られる電気化学的応答に基づいて測定する定量法において、電気化学的応答を得るための電圧を印加する際、前記第3の電極を液絡検知用電極としてだけでなく参照極としても併用するために、基準となる電位の変動が殆どない。従って、本発明によれば、試料中の特定化合物について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することができる。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

【実施例1】グルコースの定量法を説明する。グルコースセンサは図1に示すものを使用した。図1は、反応層を除いたグルコースセンサの分解斜視図を示す。このグルコースセンサは、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1、カバー9、および基板1とカバー9との間にサンドイッチされるスペーサ10を有する。これらは図1の中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着されてグルコースセンサが構成される。スペーサ10には試料液供給路を形成するためのスリット11が設けられ、また、カバー9には試料液供給路に通じる空気孔12が形成されている。基板1上にスペーサ10を介してカバー9を積層して接着すると、基板1、スペーサ10およびカバー9によってスリット11の部分に試料液供給路となる空間部が形成され、この空間部の終端部は上記空気孔12に連通する。

【0012】基板1には、作用極5、対極8、および第3の電極7が設けられ、さらにこれらにそれぞれ電気接続されるリード2、4および3が設けられている。作用極5は、リング状の対極8の内側に配置されている。第3の電極7は、試料液供給路の入口11aに対して作用極8から離れた位置に配置されている。電極7を除く前記電極系（作用極5および対極8）上には反応層（図示しない）が設けられている。図中、6は絶縁層である。上記作用極5、電極7および対極8は、それぞれ上記空間部に露出するように設けられている。

【0013】上記グルコースセンサは以下のようにして作製した。まず、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷してリード2、3および4をそれぞれ形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極5を形成した。作用極5は上記リード2と接触している。次に、その基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成した。絶縁層6は、上記作用極5の外周部を覆っており、これによって作用極5の露出部分の面積は一定に保たれる。絶縁層6は、リード2、3および4の一部を覆っている。上記リ

ード3の先端を露出させることにより、電極7を形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード4と接触するように基板1上に印刷して対極8を形成した。

【0014】次に、電極7を除く前記電極系（作用極5および対極8）上にカルボキシメチルセルロース（以下CMCという。）の水溶液を滴下し、乾燥させることでCMC層を形成した。さらに、電極7を除く前記電極系（作用極5、対極8）上に、酵素としてのGODおよび電子受容体としてのフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を滴下し、乾燥させることで反応層を形成した。次に、反応層上に、試料液の反応層への供給をより一層円滑にするために、レシチンの有機溶媒溶液、例えばトルエン溶液を、試料液供給路の入口11aから反応層上にわたって広げ、乾燥させることでレシチン層を形成した。次に、基板1に、カバー9およびスペーサ10を図1中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着してグルコースセンサを作製した。

【0015】このセンサに、試料液としてグルコース水溶液3 $\mu$ lを試料液供給路にその入口11aより供給した。試料液は毛管現象により試料液供給路を通して空気孔12にまで達し、電極系上の反応層が溶解した。試料液の供給と同時に、電極系の対極8と電極7間の抵抗値の変化に基づいて液の供給を検知するシステムが動作し、測定装置の測定タイマーが始動した。55秒経過後、電極系の電極7を基準にして所定の電位が作用極5に印加され、5秒後の作用極5—電極7間の電流値が測定された。すなわち、反応層が試料液に溶解し、液中のフェリシアン化イオン、グルコース、およびGODが反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。この生成するフェロシアン化イオンを酸化する電流が上記応答電流に相当する。その結果、試料液中のグルコース濃度に依存した電流値が得られた。

【0016】作用極5への電位印加時に、電極7の電位を銀／塩化銀電極を基準にして測定したところ、作用極5において酸化反応が生じているにもかかわらず、電極7の電位の変動は殆ど見られなかった。また、作用極一対極間の抵抗値変化に基づいて液絡検知を行っていた従来法に比べて、応答値のばらつきが少なくなり応答特性が向上した。

【0017】この実施例では、電極7は、試料液供給路の入口11aに対して最も奥側に配置されているため、3つの電極全てを含む空間部が試料液で満たされて初めて、対極8—電極7間の抵抗値変化が検知される。これにより、試料液供給路より供給された試料液が反応層の全体を覆うまでに達したかどうかを、確実に判定することができる。本実施例においては、電極7上に反応層が形成されていない場合について述べたが、電極7上に反応層を形成した場合においても、同様の結果が得られ

た。さらに、上記実施例ではカバー 9 を接着させたセンサについて述べたが、これに限定されることはなく、カバー 9 がないセンサにおいても、試料液は試料液供給路を通じて 3 電極系に供給することができ、グルコース濃度に依存するセンサ応答が得られた。

【0018】〔実施例 2〕本実施例で用いたグルコースセンサの電極系の配置を図 2 に示す。このグルコースセンサにおいては、基板 1 上に設けられた対極 8 は、切欠部 2 1 を有する略 C 字形に形成されている、そして、略 C 字形の対極 8 の中央に配置された作用極 5 のリード 2 は、切欠部 2 1 を通って対極 8 の外側へ導かれている。その他の構成は実施例 1 のものと同様である。次に、このグルコースセンサの作製方法を説明する。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板 1 に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード 2、3 および 4 を形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをその基板 1 に印刷して作用極 5 および対極 8 を形成した。作用極 5 はリード 2 と接触しており、対極 8 はリード 4 と接触している。次に、基板 1 上に絶縁性ペーストを印刷して絶縁層 6 を形成した。絶縁層 6 は、作用極 5 の外周部を覆っており、これによって作用極 5 の露出部分の面積は一定に保たれる。また、絶縁層 6 は、リード 2、3 および 4 の一部を覆っている。電極 7 は、リード 3 の先端を露出させることにより形成した。以後は、実施例 1 と同様の工程を経てグルコースセンサを作製した。

【0019】得られたグルコースセンサを用いて、実施例 1 と同様に、試料液としてグルコース水溶液  $3\mu\text{l}$  をその試料液供給路にその入口 1 1 a より供給して、応答電流値を測定した。その結果、実施例 1 と同様に試料液の有無を確実に判定することができ、かつグルコース濃度に依存するセンサ応答が得られた。本実施例によれば、作用極 5 に接続されたリード 2 を対極 8 に設けた切欠部 2 1 を通って対極 8 の内部から外部へ導出するようにしているので、作用極 5 および対極 8 を基板 1 上に同時に印刷により形成することができる。従って、実施例 1 に比較して製造工程が工程削減され、バイオセンサの製造コストを削減することができた。

【0020】〔実施例 3〕実施例 2 と同様のグルコースセンサを作製した。このグルコースセンサ B を図 3 に示す回路を有する測定器 A に接続した。グルコースセンサ B は、基板 1 上に形成された作用極 5、対極 8、および液絡検知用電極として使用される第 3 の電極 7 を含む電極系を有している。作用極 5 にはリード 2 を介して端子 2 a が接続され、対極 8 にはリード 4 を介して端子 4 a が接続され、電極 7 にはリード 3 を介して端子 3 a が接続されている。測定器 A は、グルコースセンサのそれぞれの端子 2 a、3 a および 4 a に接続される端子 1 6、1 5 および 1 7 を有するコネクタ 1 4 と、コネクタ 1 4 の端子 1 5 に接続される電流検出部 1 8 と、端子 1 6 に

スイッチ 1 3 を介して接続される A/D 変換回路 1 9 と、マイクロコンピュータなどよりなる制御部 2 0 とを有する。

【0021】端子 3 a と 4 a 間には、図示しない電源により一定電位が印加されているので、センサ B に試料液が供給されると、電極 7 ー対極 8 間に流れる電流を電流検出部 1 8 にて検知することで液の供給を検知するシステムが動作し、スイッチ 1 3 がオンする。そして、制御部 2 0 を介して測定タイマーがスタートする。一定時間後、例えば 5 5 秒後に、センサ B の作用極 5 と対極 8 間には応答電流を得るために必要な一定電圧が印加される。こうして作用極 5 と対極 8 間に流れる電流は、電圧に変換され、その電圧値は A/D 変換回路 1 9 によりある一定時間でのパルス数に変換される。制御部 2 0 はそのパルス数をカウントし、応答値を算出し、その結果を表示する。上記のようにして測定タイマーが作動した後、所定時間経過後、対極 8 を基準にして所定の電位を作用極 5 に印加し、5 秒後に作用極 5 と対極 8 間に流れる電流値を測定したところ、試料中のグルコースに依存した電流応答が得られた。実施例 1 と同様に、試料液の有無を確実に判定することができ、試料液が電極 7 に到達しない限り測定を開始しない。故に液量差による測定誤差が従来に比べ大幅に減少した。同様の結果は、電極 7 を対極として用いた場合にも得られた。本実施例のような測定において、応答電流を得るための電圧を印加する場合、電極 7、すなわち、第 3 の電極と対極 7 とを区別する必要はない。

【0022】〔実施例 4〕本実施例で用いたグルコースセンサの電極系の配置を図 4 に示す。このグルコースセンサにおいては、基板 1 上に設けられた略 C 字形の対極 8 の試料液供給路の入口 1 1 a から遠い方の周縁に、切欠部 2 2 が設けられ、この切欠部 2 2 内に電極 7 が配置されている。反応層は作用極 5 および対極 8 と同様に、電極 7 上にも設けられている。その他の構成は、実施例 2 のものと同様である。このグルコースセンサは、電極 7 上にも、作用極 5 および対極 8 と同様に、反応層を形成した以外は、実施例 2 と同様の工程を経て作製した。得られたグルコースセンサを用いて、実施例 1 と同様に、試料液としてグルコース水溶液  $3\mu\text{l}$  をその試料液供給路へ入口 1 1 a より供給して、応答電流値を測定した。その結果、実施例 1 と同様に、試料液中のグルコース濃度に依存した電流応答が得られた。本実施例のグルコースセンサによれば、電極 7 を対極 8 に設けた切欠部 2 2 内に配置することで、電極 7 上への反応層の形成が容易となった。さらに、作用極 8 と電極 7 との間の距離が短くなったため、電位印加時における電圧降下の影響が減少した。

【0023】〔実施例 5〕本実施例で用いたグルコースセンサの電極系の配置を図 5 に示す。このグルコースセンサにおいては、基板 1 上に設けられた略 C 字形の対極



8の試料液供給路の入口11aに近い方の周縁に、切欠部22が設けられ、この切欠部22内に電極7が配置されている。反応層は作用極5および対極8と同様に、電極7上にも設けられている。その他の構成は実施例2と同様である。このグルコースセンサは、電極7上にも、作用極5および対極8と同様に、反応層を形成した以外は、実施例2と同様の工程を経て作製した。得られたグルコースセンサを用いて、実施例1と同様に、試料液としてグルコース水溶液3 $\mu$ lをその試料液供給路の入口11aより供給して、応答電流値を測定した。その結果、実施例1と同様に、試料液中のグルコース濃度に依存した電流応答が得られた。さらに、本実施例によれば、基板1上のより試料液供給路の入口11aに近い位置に電極7を配置することで、試料液供給時に電極7が確実にその試料液に浸漬する。その結果、電極7を参照極として用いる場合、基準電位がより安定し、ばらつきの少ない応答結果が得られた。

【0024】〔実施例6〕本実施例で用いたグルコースセンサの電極系の配置を図6に示す。このグルコースセンサにおいては、基板1上に設けられた略C字形の対極8と、対極8の内側に配置された作用極5との間に形成された空間部23に電極7が配置されている。電極7は略C字形に形成されている。反応層は作用極5および対極8と同様に、電極7上にも設けられている。その他の構成は実施例2のものと同様である。本実施例のグルコースセンサは以下のようにして作製した。ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷しリード2、3および4を形成した。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷して作用極5および電極7を形成した。作用極5はリード2と接触しており、電極7はリード3と接触している。次に、その基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成した。絶縁層6は、作用極5および電極7の外周部を覆っており、これによって作用極5および電極7の露出部分の面積は一定に保たれる。さらに、絶縁層6は、リード2、3および4の一部を覆っている。次に、その基板1上に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード4と接触するように印刷して対極8を形成した。以後、実施例4と同様の工程を経て、グルコースセンサを作製した。

【0025】得られたグルコースセンサを用いて、実施例1と同様に、試料液としてグルコース水溶液3 $\mu$ lをその試料液供給路の入口11aより供給して、応答電流値を測定した。その結果、実施例1と同様に、試料液中のグルコース濃度に依存した電流応答が得られた。さらに、本実施例によれば、電極7を作用極5の外周に配置することで、電極7を参照極として用いる場合、作用極5への電位印加がより安定し、その結果センサ応答特性が向上した。

【0026】〔実施例7〕図7は、本実施例で用いた測

定器の回路図の一例である。センサBが測定器Aの所定の位置にセットされたことを制御部28が検知すると、電極7と対極8との間に直流電源34により500mVの電圧が印加される。電極7と対極8との間に流れる電流は、電流／電圧変換回路26で電圧に変換され、その電圧値はA／D変換回路27により一定時間でのパルス数にカウントされる。そこで、試料液がセンサに供給され、電極7と対極8とが液絡し、前記A／D変換回路27でカウントされる一定時間でのパルス数の増加としてコネクタ25の端子32-33間の電気抵抗の変化が検知されると、制御部28が測定タイマーをスタートさせる。この時、電極7と対極8との間には、継続して500mVが印加されており、一連の動作が終了するまでこの電圧が印加され続ける。この電圧は一定である必要はなく、変動してもよい。このように、電極7と対極8との間に継続して所定の電圧を印加するために、端子32と制御部28との間にはスイッチ部品を必要としない。これにより測定器の製造コストを削減することができる。

【0027】一定時間経過後スイッチ29が接続され、作用極5と電極7との間には、応答電流を得るために必要な一定電圧500mVが直流電源35により印加される。こうして作用極5と対極8との間に流れる電流は、電流／電圧変換回路26aにより電圧に変換され、その電圧値はA／D変換回路27aにより一定時間でのパルス数に変換される。制御部28はそのパルス数をカウントし応答値を算出し、その結果を表示する。液絡検知のために、電極7と対極8との間に継続して所定の電圧を印加することによるセンサ応答への影響は、殆ど観察されなかった。

【0028】図8に示す測定器は、コネクタ25の端子31、32に接続が切り替え可能なスイッチ29を設けたものである。すなわち、試料液の供給による電極7と対極8間の液絡を検知し、作用極5と対極8または電極7との間に、応答電流を得るために必要な一定電圧が印加されるまで、スイッチ29は端子32に接続されている。この間、電極7と対極8との間には継続して所定の電圧が印加されていてもよい。スイッチ29を切り替え型にすることで、電流／電圧変換回路26およびA／D変換回路27を併用することができ、製造コストを削減することができる。一定時間経過後スイッチ29が端子31に接続され、作用極5と対極8または電極7との間に、応答電流を得るために500mVが印加される。34は直流電源を表す。

【0029】上記実施例においては、液絡検知のための印加電圧を500mVとしたが、これに限定されることなく、電極7と対極8との間の電気的変化が検出できる電圧であればよい。また、応答電流を得るための電圧を500mVとしたが、これに限定されることなく、一連の反応の結果生じた電子受容体の還元体を酸化でき

る電圧であればよい。上記実施例においては、親水性高分子としてカルボキシメチルセルロース（CMC）を用いたが、親水性高分子層を形成する親水性高分子には、種々のものが使用される。例えば、ヒドロキシエチルセルロース（HEC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸およびその塩、メタアクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸およびその塩があげられる。その中でも、CMC、HEC、HPC、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロースが好ましい。ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリビニルアルコール、ポリスチレンスルホン酸なども使用できる。

【0030】反応層に含有させる酸化還元酵素は、試料液に含まれる基質に応じて適宜選択することができる。酸化還元酵素としては、例えば、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどがあげられる。上記電子受容体としては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体などがあげられる。また、酸素を電子受容体とした場合にもセンサ応答が得られる。電子受容体は、これらの一種または二種以上が使用される。上記酵素および電子受容体は、試料液に溶解させてもよく、反応層を基板などに固定することによって試料液に溶けないようにしてもよい。酵素および電子受容体を固定化する場合、反応層は、上記親水性高分子を含有することが好ましい。

【0031】さらに、反応層は、pH緩衝剤を含有することができる。pH緩衝剤としては、リン酸二水素カリウム-リン酸二カリウム、リン酸二水素カリウム-リン酸二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム-リン酸二カリウム、リン酸二水素ナトリウム-リン酸二ナトリウム、クエン酸-リン酸二ナトリウム、クエン酸-リン酸二カリウム、クエン酸-クエン酸三ナトリウム、クエン酸-クエン酸三カリウム、クエン酸二水素カリウム-水酸化ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム-水酸化ナトリウム、マレイン酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム、フタル酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム、コハク酸-四ホウ酸ナトリウム、マレイン酸-トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン-トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩塩、[N-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸]-水酸化ナトリウム、[N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-

アミノエタンスルホン酸]-水酸化ナトリウム、[ピペラジン-N, N'-ビス（2-エタンスルホン酸）]-水酸化ナトリウムがあげられる。

【0032】上記実施例では、電極系のいくつかの例を図示したが、電極、リードの配置はこれらに限定されるものではない。また、上記実施例では第3の電極の材料として銀とカーボンについて述べたが、これに限定されることはなく、他の導電性材料や銀/塩化銀電極なども使用できる。さらに、上記実施例ではカバー部材を接着させたセンサについて述べたが、これに限定されることはなく、カバー部材がないセンサにおいても、グルコース濃度に依存するセンサ応答が得られる。

【0033】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、試料中の特定化合物について、迅速かつ高精度な定量を簡便に実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるグルコースセンサの反応層を除去した状態の分解斜視図である。

【図2】本発明の他の実施例におけるグルコースセンサの電極系の配列を示す基板の平面図である。

【図3】図2に示すバイオセンサおよびそれに接続される測定器の回路の例を示す図である。

【図4】本発明のさらに他の実施例におけるグルコースセンサの電極系の配列を示す基板の平面図である。

【図5】本発明のさらに他の実施例におけるグルコースセンサの電極系の配列を示す基板の平面図である。

【図6】本発明のさらに他の実施例におけるグルコースセンサの電極系の配列を示す基板の平面図である。

【図7】本発明のバイオセンサおよびそれに接続される測定器の回路の例を示す図である。

【図8】本発明のバイオセンサおよびそれに接続される測定器の回路の他の例を示す図である。

【符号の説明】

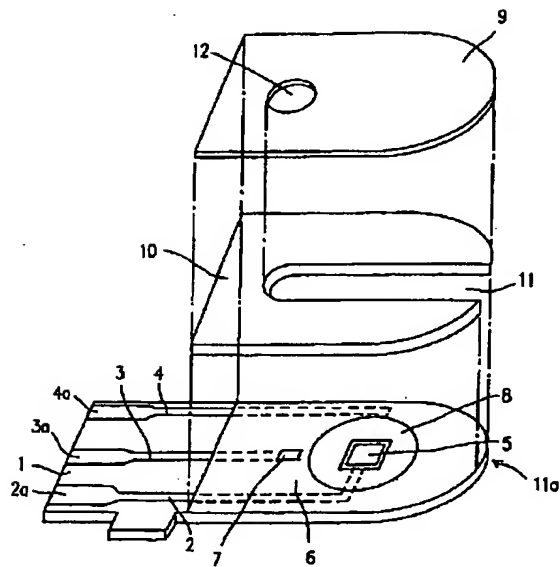
- 1 絶縁性の基板
- 2、3、4 リード
- 5 作用極
- 6 絶縁層
- 7 第3の電極
- 8 対極
- 9 カバー
- 10 スペーサ
- 11 試料液供給路を形成するスリット
- 11a 試料液供給路の入口
- 12 空気孔
- 13 スイッチ
- 14 コネクタ
- 15、16、17 端子
- 18 電流検出器
- 19 A/D変換回路



- 20 制御部  
21 切欠部  
22 切欠部  
23 空間部  
25 コネクタ  
26、26a 電流／電圧変換回路

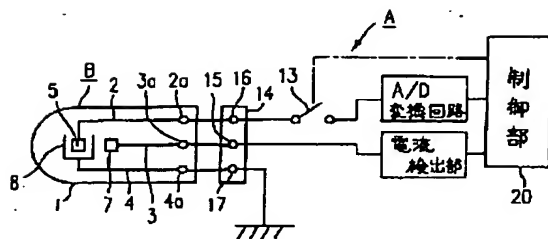
- 27、27a A/D変換回路  
28 制御部  
29 スイッチ  
31、32、33 端子  
34、35 電源

【図1】

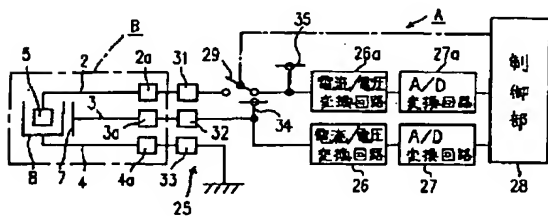


- 1 基板  
5 作用極  
7 第3の電極  
8 対極

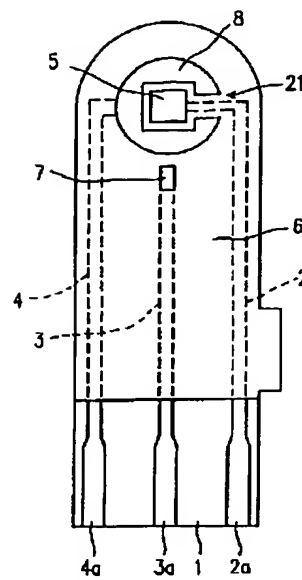
【図3】



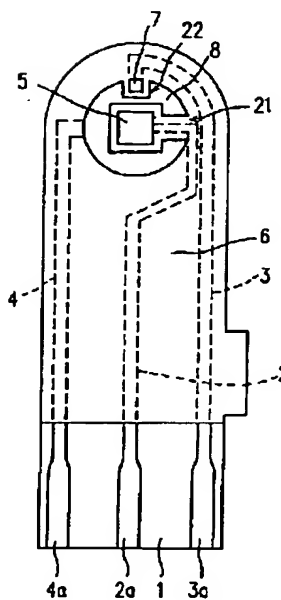
【図7】



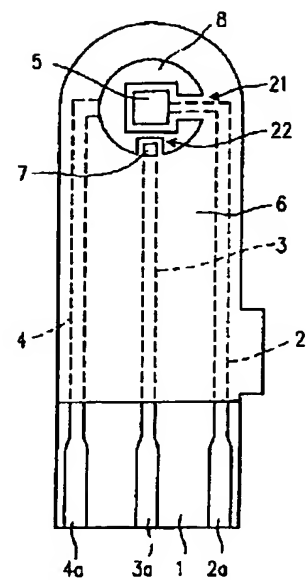
【図2】



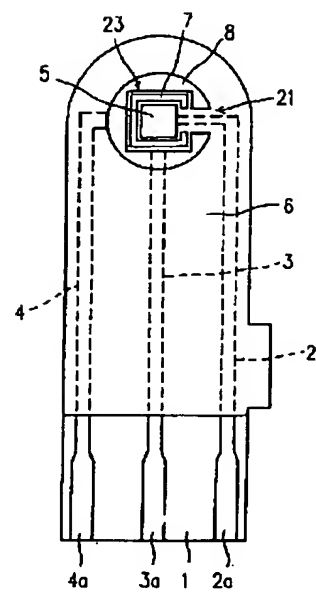
【図5】



【図4】

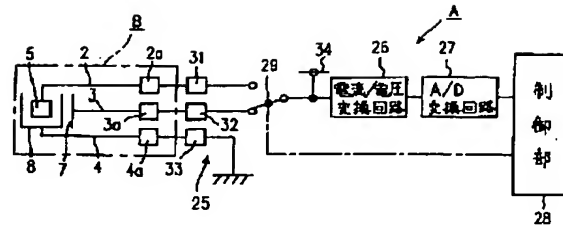


【図6】



BEST AVAILABLE COPY

【図 8】



フロントページの続き

(72) 発明者 堤 治寛  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内  
(72) 発明者 馬場 英行  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 徳野 吉宣  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内  
(72) 発明者 宮崎 正次  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

BEST AVAILABLE COPY